

金乌贼染色体核型分析

王晓华^{①②} 吴彪^② 李琪^① 陈四清^{②*} 庄志猛^② 刘长琳^② 孙建明^② 杨爱国^②

① 中国海洋大学 水产学院 青岛 266003; ② 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071

摘要:以金乌贼(*Sepia esculenta*)受精卵及发育的胚胎为材料,采用空气干燥法制备染色体。经 Giemsa 染色,镜检细胞分裂相。结果显示,金乌贼染色体数目 $2n = 92$,核型公式为 $2n = 44m + 32sm + 10st + 6t$,染色体总臂数 $NF = 168$ 。

关键词:金乌贼;染色体;核型

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)02-77-05

Karyotype Analysis of Golden Cuttlefish *Sepia esculenta*

WANG Xiao-Hua^{①②} WU Biao^② LI Qi^① CHEN Si-Qing^{②*} ZHUANG Zhi-Meng^②
LIU Chang-Lin^② SUN Jian-Ming^② YANG Ai-Guo^②

① Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003;

② Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Qingdao 266071, China

Abstract: The metaphase chromosomes of golden cuttlefish (*Sepia esculenta*) were prepared from the oosperm and embryo cells by air drying. The karyotype was analyzed. The results showed that there were 92 telocentric chromosomes and the karyotype was $2n = 44m + 32sm + 10st + 6t$, $NF = 168$.

Key words: *Sepia esculenta*; Chromosome; Karyotype

金乌贼(*Sepia esculenta*)俗称乌鱼、墨鱼、乌子、针墨鱼,是我国北方沿海经济价值较大的头足类,在我国海洋生物中占有相当重要的地位。金乌贼具有营养丰富、生长快等特点,具有较好的发展前景。

迄今为止,李嘉泳^[1]研究了金乌贼的生殖洄游和发育特征;魏臻邦^[2]研究了金乌贼的生活习性;郝振林等^[3]研究了金乌贼的生物学特性;刘长琳等^[4]研究了金乌贼繁殖特性。有关金乌贼细胞遗传学和核型分析研究在国内尚未见到报道。1966年, Ojima 等^[5]首次采用低渗处理和空气干燥法制片,进行鱼类染色体研究并取得成功;1979年, 管瑞光等^[6]将低渗-空气干燥法应用到鱼类胚胎细胞染色体标本制备的研究中,也取得了良好效果;目前的鱼类染色体制片大多采用这种方法,例如:霍蕊等^[7]对波

纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)染色体的研究,朱冬发等^[8]对东方扁虾(*Thenus orientalis*)染色体的研究,黄荣莲等^[9]对合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)染色体的研究都采用了低渗-空气干燥法进行制片。通过试验性测定,认为该方法也适用于金乌贼染色体的制备。

本实验制备金乌贼染色体并分析其核型,以期为金乌贼的遗传背景和资源保护提供种质特征方面的相关资料。

基金项目 国家高科技研究发展计划(863计划)项目(No. 2010AA10A404),青岛市科技发展计划项目(No. 07-1-4-12-hy);

* 通讯作者, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn;

第一作者介绍 王晓华,男,硕士研究生;研究方向:海水养殖,苗种繁育;E-mail: wangxiaohuame@yahoo.cn。

收稿日期:2010-11-03,修回日期:2011-01-02

1 材料与方法

1.1 实验材料 金乌贼亲体为采自青岛沿海的野生金乌贼,选择身体健硕、性成熟的个体,进行人工繁殖,实验材料使用野生金乌贼亲体人工繁殖的金乌贼受精卵及发育不同阶段的各期胚胎。

1.2 实验方法

1.2.1 染色体标本的制备 取优质的金乌贼受精卵及发育不同阶段的各期胚胎,剥去卵膜,取出受精卵及胚胎。将所得受精卵及胚胎浸入 0.04% 的秋水仙素溶液,浸泡处理 30 min,去净秋水仙素液;用 25% 过滤海水低渗处理 45 min,移去低渗液;加入 4℃ 的预冷卡诺氏液(甲醇:冰醋酸 = 3:1,体积比)固定,间隔 15 min 更换固定液一次,共更换 3 次固定液,然后加入 50% 冰醋酸进行解离,解离时间为 45 min。

将解离好的样品热滴法滴片,空气干燥过夜。干燥后的染色体玻片用 10% Giemsa 染液(pH 6.8 的磷酸缓冲液(PBS)配制)染色 30 min,慢慢冲去染液,空气中自然干燥后备用。

1.2.2 染色体数目统计及核型分析 通过显微镜观察,选取染色体分裂相分散良好的细胞,通过显微照相记录,统计染色体数目,进行染色体众数分布统计分析。

选取中期分裂相清晰的细胞染色体样品,测量和分析各个染色体的全长、长臂长和短臂长,计算其相对长度和臂比值。染色体相对长度计算公式为:染色体相对长度 = [(实测单条染色体长度 × 2) / 全部染色体长度总和] × 100。按 Levan 等^[10]提出的标准确定染色体的类型,臂数计算参照余先觉等^[11]的方法。

2 结果

2.1 染色体数目 镜检 96 个染色体中期分裂相良好的细胞进行统计,细胞染色体数目小于 92 条的比例为 16.67%,染色体数目等于 92 条的比例为 75%,染色体数目大于 92 条的比例为 8.33%。绝大多数(75%)细胞的染色体数目为 92,因此认为,金乌贼细胞染色体数目 2n

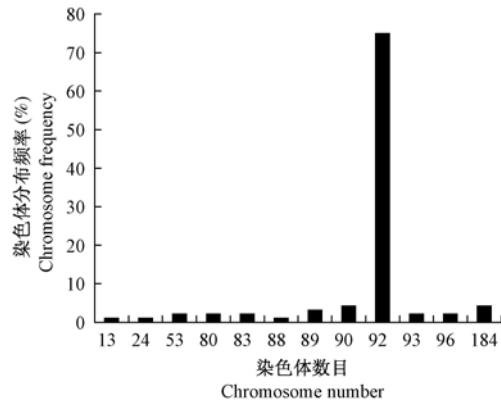


图1 金乌贼染色体分布频率
Fig.1 Distribution frequency of chromosomes in *Sepia esculenta*

= 92(图1)。

2.2 染色体核型 对 10 个有丝分裂细胞中期分裂相较好的染色体进行测量,测量其染色体长臂长及短臂长,并计算其相对长度及臂比,结果见表 1。根据 Levan^[10]提出的标准,可将金乌贼染色体分为 4 个类型,其中,m 型 22 对,sm 型 16 对,st 型 5 对,t 型 3 对。第 1 ~ 22 号染色体,臂比值处于(1.03 ± 0.06) ~ (1.67 ± 0.01) 范围内,为中部着丝粒染色体(m 型);第 23 ~ 38 号染色体,臂比值处于(1.71 ± 0.06) ~ (2.81 ± 0.04) 范围内,为亚中部着丝粒染色体(sm 型);第 40 ~ 43 号染色体处于(3.68 ± 0.05) ~ (5.69 ± 0.06) 范围内,为亚端部着丝粒染色体(st 型);第 44 ~ 46 号染色体臂比值均为 ∞,为端部着丝粒染色体(t 型)。相对长度最长为 18.69 ± 0.19,最短为 2.22 ± 0.10。

根据染色体的相对长度、着丝粒位置和特征,可以确定金乌贼染色体的核型公式为 2n = 44m + 32sm + 10st + 6t = 92,染色体臂数(NF) = 168(图 2)。

3 讨论

3.1 金乌贼染色体的制备 实验以金乌贼受精卵、发育的胚胎作为染色体制备研究材料。实验发现以受精卵为材料制备的染色体标本中,染色体分散不开,中期分裂相少或不清晰,

表 1 金乌贼染色体的相对长度和臂比值

Table 1 Relative length and ratio of chromosomes in *Sepia esculenta*

染色体序号 Chromosome pair	染色体相对长度 Relative length Mean ± SD	臂比值 Arm ratio	染色体类型 Type	染色体序号 Chromosome pair	染色体相对长度 Relative length Mean ± SD	臂比值 Arm ratio	染色体类型 Type	
1	18.69 ± 0.19	1.46 ± 0.02	m	24	13.60 ± 0.28	1.82 ± 0.02	sm	
2	14.79 ± 0.32	1.64 ± 0.03		25	13.52 ± 0.13	1.71 ± 0.06		
3	14.75 ± 0.26	1.27 ± 0.07		26	13.48 ± 0.28	2.21 ± 0.03		
4	14.66 ± 0.13	1.49 ± 0.02		27	12.97 ± 0.11	1.91 ± 0.03		
5	14.65 ± 0.41	1.45 ± 0.05		28	12.59 ± 0.09	2.09 ± 0.05		
6	14.58 ± 0.15	1.67 ± 0.01		29	12.46 ± 0.18	2.06 ± 0.07		
7	14.20 ± 0.47	1.64 ± 0.09		30	12.29 ± 0.24	1.84 ± 0.02		
8	13.10 ± 0.17	1.03 ± 0.06		31	11.95 ± 0.36	1.85 ± 0.03		
9	12.46 ± 0.42	1.51 ± 0.05		32	11.44 ± 0.08	2.11 ± 0.02		
10	11.87 ± 0.14	1.39 ± 0.02		33	10.92 ± 0.23	2.40 ± 0.08		
11	11.74 ± 0.35	1.37 ± 0.02		34	10.47 ± 0.21	1.98 ± 0.06		
12	11.70 ± 0.16	1.36 ± 0.02		35	10.17 ± 0.15	2.04 ± 0.06		
13	11.15 ± 0.22	1.60 ± 0.07		36	9.54 ± 0.02	2.69 ± 0.01		
14	10.38 ± 0.04	1.43 ± 0.06		37	9.37 ± 0.17	2.81 ± 0.04		
15	10.34 ± 0.19	1.44 ± 0.03		38	7.71 ± 0.28	1.94 ± 0.07		
16	10.13 ± 0.29	1.19 ± 0.06		39	10.93 ± 0.19	3.37 ± 0.01		
17	9.58 ± 0.32	1.19 ± 0.02		40	8.64 ± 0.19	4.23 ± 0.03		
18	9.45 ± 0.43	1.14 ± 0.07		41	8.52 ± 0.22	4.03 ± 0.03		
19	9.37 ± 0.12	1.23 ± 0.05		42	8.51 ± 0.04	3.68 ± 0.05		
20	8.73 ± 0.29	1.45 ± 0.03		43	7.08 ± 0.17	5.69 ± 0.06		
21	8.52 ± 0.20	1.54 ± 0.06		44	4.53 ± 0.36	∞		t
22	8.31 ± 0.17	1.48 ± 0.02		45	2.80 ± 0.22	∞		
23	13.65 ± 0.21	2.19 ± 0.04	46	2.22 ± 0.10	∞			

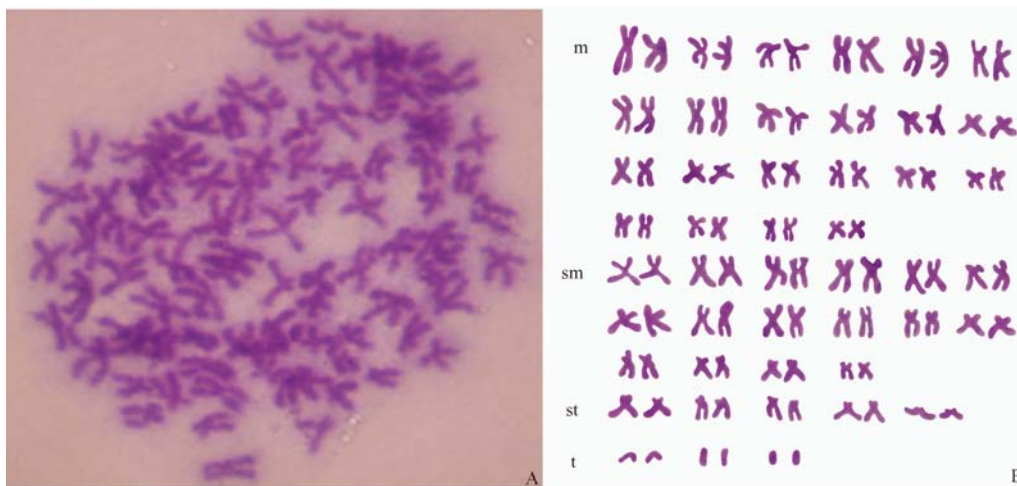


图 2 金乌贼染色体中期分裂相 (A) 及核型 (B)

Fig. 2 Metaphase chromosomes (A) and karyotype (B) of *Sepia esculenta*

推测认为受精卵卵黄丰富,在制备染色体标本过程中,容易造成染色体丢失;而以胚胎为材料制备的染色体标本中,染色体分散良好,中期分

裂相较多,且染色体形态清晰。因此认为,金乌贼染色体标本制备的材料以胚胎较好。

由于金乌贼染色体数目多,较难均匀分散,

在滴片过程中适当增加滴片高度和提高滴片时的温度,有助于染色体更好的分散。

3.2 金乌贼染色体的测定 常重杰等^[12] 研究认为,在黄河鲤鱼(*Cyprinus carpio*)中由于染色体数目较多($2n = 100$),有些染色体间区别不大,并且正中期分裂相染色体较小,前中期分裂相着丝粒位置又不十分清晰,因此在统计计量时会造成一定的误差。金乌贼染色体数目也很多,测定过程中也存在着相似的问题,而本实验金乌贼染色体数目分布较为稳定,92 条的频率为 75%,染色体数目容易准确确定;在测定过程中,染色体之间的区别及臂比值有可能存在模糊或测量误差,所以对金乌贼染色体的精确研究,有待于利用染色体显带和荧光原位杂交等技术,提高同源染色体配对的准确性,从而更精确地分析金乌贼的核型特征。

3.3 染色体数目与进化 金乌贼染色体数目为 $2n = 92$,是目前软体动物门报道的染色体数目最多的软体动物。金乌贼染色体以 m 或 sm 类型为主要染色体组成,根据 Ahmed^[13] 提出 m、sm 染色体一般导致稳定的染色体组型,而 t、st 染色体比较多变的观点,表明金乌贼有比较稳定的染色体组型。

据 Gao 等^[14] 研究与金乌贼具有相同染色体数目的头足类有枪形目枪乌贼科的长枪乌贼(*Heterololigo bleekeri*)、拟目乌贼(*Sepia lycidas*)和剑尖枪乌贼(*Photololigo edulis*),以及枪形目枪乌贼科拟乌贼属的莱氏拟乌贼(*Sepioteuthis lessoniana*),染色体数目 $2n$ 都为 92 条。从染色体方面说明金乌贼与长枪乌贼、拟目乌贼、剑尖枪乌贼、莱氏拟乌贼之间的亲缘关系较近。八腕目蛸科蛸属的短蛸(*Octopus ocellatus*)和真蛸(*O. vulgaris*)染色体数目 $2n = 60$ ^[14],从染色体方面可以看出,虽然短蛸、真蛸与金乌贼同为头足类,但是亲缘关系较远。Papan 等^[15] 研究认为与金乌贼同属的虎斑乌贼(*Sepia pharaonis*)染色体数目 $2n = 48$,其与金乌贼的亲缘关系有待考证。

我国已报道的 40 种海洋贝类的染色体组型研究结果显示,腹足纲的染色体数目有 $2n =$

30、34、36 和 60^[16-17];双壳纲的染色体数目有 $2n = 20、22、28、32、34$ 和 38 等几种类型^[16-19],明显比金乌贼染色体数目少。

在节肢动物门十足类中,有研究认为染色体数目多的类型较为进化^[20]。与软体动物门的其他类群相比,头足类在形态结构上具有高度进化的特征^[21],金乌贼染色体数目较已知的软体动物门其他纲种类的染色体数目多。但软体动物与节肢动物十足类在染色体数目与进化的关系方面是否具有相似的倾向,尚有待对更多头足类染色体的深入研究。

参 考 文 献

- [1] 李嘉泳. 金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle)在我国黄渤海的生殖洄游和发育//太平洋西部渔业研究委员会中国委员会专家办公室. 太平洋西部渔业研究委员会第六次全体会议论文集. 北京:科学出版社,1965:61-92.
- [2] 魏臻邦. 金乌贼生活习性的初步观察. 动物学杂志,1964,(3):132-134.
- [3] 郝振林,张秀梅,张沛东. 金乌贼的生物学特性及增殖技术. 生态学杂志,2007,26(4):601-606.
- [4] 刘长琳,庄志猛,陈四清,等. 金乌贼亲体驯养与繁殖特性研究. 渔业现代化,2009,36(2):34-42.
- [5] Ojima Y S, Hitotsumachi S. Cytogenetic studies in lower vertebrates. Proc Jap Acad, 1966, 42(1):62-66.
- [6] 咎瑞光,宋峥. 草鱼、团头鲂染色体组型的分析比较. 遗传学报,1979,6(2):205-209.
- [7] 霍蕊,张本,陈国华,等. 波纹唇鱼染色体核型分析. 海洋科学,2009,33(4):94-97.
- [8] 朱冬发,李少菁,王桂忠. 东方扁虾的染色体. 厦门大学学报:自然科学版,2000,39(6):844-848.
- [9] 黄荣莲,杜晓东,叶富良. 合浦珠母贝两个种群染色体组型的分析. 湛江海洋大学学报,2001,21(1):1-5.
- [10] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas,1964,52(2):201-220.
- [11] 余先觉,周瞰,李渝成,等. 中国淡水鱼类染色体. 北京:科学出版社,1989:84.
- [12] 常重杰,杜启艳,单元勋,等. 黄河鲤鱼的染色体组型和银染带的研究. 河南水产,1994,1:29-31.
- [13] Ahmed M. Chromosome cytology of marine pelecypod molluscs. J Sci Karachi, 1976, (4):77-94.
- [14] Gao Y M, Natsukari Y. Karyological studies on seven cephalopods. Venus, 1990, 49(2):126-145.

- [15] Papan F, Jazayeri A, Ebrahimipour M. The study of Persian gulf cuttlefish (*Sepia pharaonis*) chromosome via incubation of blood cells. *Journal of American Science*, 2010, 6(2): 162 - 164.
- [16] 孙振兴. 中国海洋贝类染色体研究进展. *海洋通报*, 2004, 23(6): 77 - 82.
- [17] 王梅林, 郑家声, 朱丽岩, 等. 我国海洋鱼类和贝类染色体组型研究进展. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(2): 277 - 284.
- [18] 王琼, 童裳亮. 贻贝核型及染色体带型分析. *动物学报*, 1994, 40(3): 309 - 316.
- [19] 林加涵, 洪水根. 僧帽牡蛎染色体组型研究. *福建水产*, 1986, 1: 16 - 19.
- [20] Murofuchi M, Deguchi Y. Karyotype evolution in Decapoda Crustacea // Hirano R, Hanyu I. *Proc Second Asian Fisheries Forum*. Tokyo: Japan Asian Fisheries, 1990: 549 - 553.
- [21] 刘凌云, 郑光美. *普通动物学*. 北京: 高等教育出版社, 1997: 221 - 231.

勘 误

本刊 2010 年 45 卷第 6 期 145 页王开锋“甘肃马鬃山发现小地兔”一文中图 2v 有误, 现修正如下:

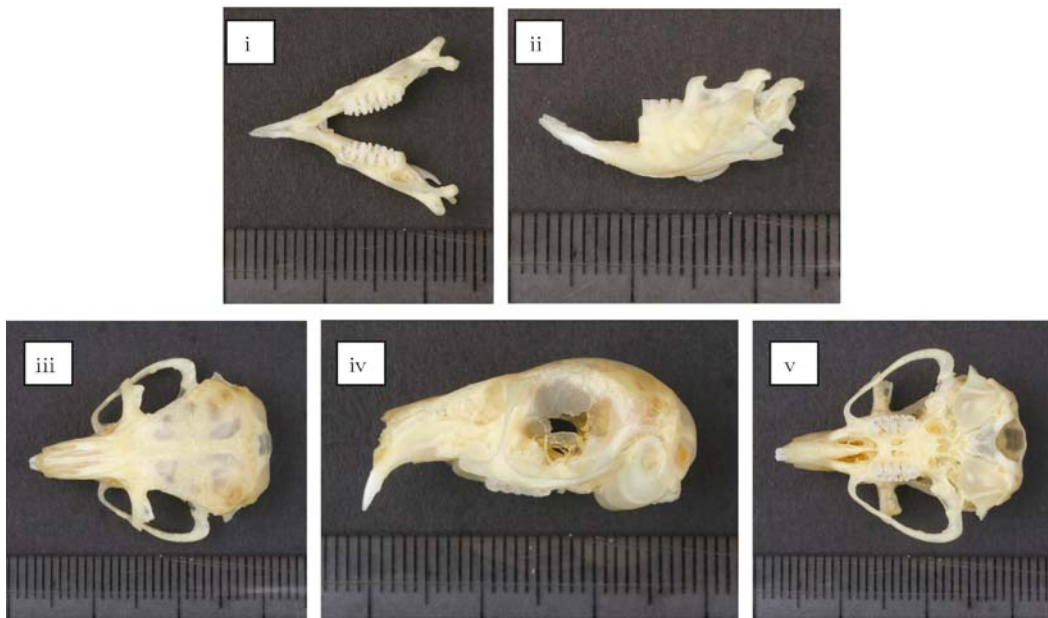


图 2 小地兔头骨

Fig. 2 Skull of Little Earth Hare (*Pygeretmus pumilio*) from Mazongshang, Gansu Province

i. 下颌背面观; ii. 下颌侧面观; iii. 上颌背面观; iv. 上颌侧面观; v. 上颌腹面观。

i. Dorsal view of mandibula; ii. Lateral view of mandibula; iii. Dorsal view of maxilla;

iv. Lateral view of maxilla; v. Ventral view of maxilla.